

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

008129052

WPI Acc No: 1990-016053/ 199003

XRAM Acc No: C90-006872

New fragments of monoclonal antibody mAK 195 - which neutralise the toxic effects of tumour necrosis factor, in vivo and in vitro

Patent Assignee: BASF AG (BADI)

Inventor: EMLING F; KURFUERST M; MEYER T; MOELLER A

Number of Countries: 015 Number of Patents: 006

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 350690	A	19900117	EP 89111538	A	19890624	199003 B
DE 3823804	A	19900118	DE 3823804	A	19880714	199004
FI 8903428	A	19900115				199012
DK 8903467	A	19900115				199014
JP 2109994	A	19900423	JP 89180674	A	19890714	199022
ZA 8905325	A	19910424	ZA 895325	A	19890713	199121

Priority Applications (No Type Date): DE 3823804 A 19880714

Cited Patents: 1.Jnl.Ref; A3...9027; EP 260610; EP 355067; No-SR.Pub

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

EP 350690	A	G	3		
-----------	---	---	---	--	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE

Abstract (Basic): EP 350690 A

The F(ab')₂ and/or F(ab) fragments of the monoclonal antibody mAK 195 are new.

USE/ADVANTAGE - mAK 195 is already known as an anti-TNF-alpha (tumour necrosis factor) antibody, which neutralises, in vitro or invivo, the toxic effects of TNF (which are implicated in conditions such as endotoxic shock, kidney failure, acute respiratory distress syndrome, graft-host rejection, etc.). The new fragments have similar neutralising activity but compared with the intact antibody penetrate more easily into tissues and elicit less of an immune response.

In an example. mAK 195 was incubated, for 90 min. at 37 deg. C in pH4.5-0.5M NaCl buffer, with 30 microg/mg antibody of pepsin. The mixt. was centrifuged (to remove Fc fragments) and the supernatant put onto a column of 'Sephacryl S-200' (RTm). The F(ab')₂ fragment contg. fractions were combined and residual antibody removed on a column of 'Protein A-Sepharose' (RTm). F(ab) fragments are made by a similar method but using cystine-activated papain as enzyme.

0/0

Title Terms: NEW; FRAGMENT; MONOCLONAL; ANTIBODY; NEUTRALISE; TOXIC; EFFECT ; TUMOUR; NECROSIS; FACTOR; VIVO; VITRO

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; A61K-039/39;

C07D-000/00; C07K-015/06; C12N-005/00; C12P-021/08

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B04C5; D05-H11

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M710 M903 P433 P722 P820 Q233 V600 V611

Abstract for AP3

19



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

11

Veröffentlichungsnummer:

**0 350 690
A2**

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21

Anmeldenummer: 89111538.8

51

Int. Cl. 4: C07K 15/06 , A61K 39/395

22

Anmeldetag: 24.06.89

30

Priorität: 14.07.88 DE 3823804

43

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
17.01.90 Patentblatt 90/03

64

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE

71

Anmelder: BASF Aktiengesellschaft
Carl-Bosch-Strasse 38
D-6700 Ludwigshafen(DE)

72

Erfinder: Moeller, Achim, Dr.
Wilhelm-Busch-Strasse 51
D-6703 Limburgerhof(DE)
Erfinder: Emiling, Franz, Dr.
Valentin-Bauer-Strasse 22
D-6700 Ludwigshafen(DE)
Erfinder: Kurfuerst, Manfred, Dr.
Anilinstrasse 71
D-6733 Hassloch(DE)
Erfinder: Meyer, Thomas, Dr.
Gruenerstrasse 14 a
D-6700 Ludwigshafen(DE)

54

Neutralisation der in vitro- und in vivo-toxischen Eigenschaften von TNF-alfa durch monoklonale Antikörper und die davon abgeleiteten Fragmente.

57

Es werden Fragmente des monoklonalen Antikörpers MAK 195 beschrieben, die sich zur Bekämpfung von Krankheiten eignen.

EP 0 350 690 A2



Neutralisation der in vitro und in vivo toxischen Eigenschaften von TNF- α durch monoklonale Antikörper und die davon abgeleiteten Fragmente

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Verwendung von von neutralisierenden anti-TNF- α monoklonalen Antikörpern abgeleiteten F(ab')₂- und F(ab)-Fragmenten zur Neutralisation der in vitro und in vivo toxischen Eigenschaften von TNF- α .

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wurde zuerst bei antitumoralen Studien im Serum von Mäusen gefunden, wobei diese zuerst mit Bazillus Calmette-Guerin und anschließend mit Endotoxin injiziert wurden. (Carswell, E.A. et al; Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1975), 72: 3666-3670). Diese anfänglichen Untersuchungen am TNF- α lenkten die Aufmerksamkeit besonders auf die anscheinend selektive Anti-Tumor-Funktion dieses Lymphokins. So wurden nekrotische Effekte auf verschiedene transplantable Tumore der Maus und cytotoxische Aktivität gegen Tumorzellen in Kultur gefunden (Pick, E. Lymphokines (1987), 14: 223-252).

Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, daß TNF- α ein weites Spektrum an biologischen Aktivitäten auf verschiedene nicht maligne Zelltypen hat (Pick, E. Lymphokines (1987) 14: 203-223).

Besonders intensiv wurde die Rolle von TNF- α bei Studien zum Schock und bei Gewebeverletzungen untersucht. Ursprünglich wurde angenommen, daß dies durch einen direkten Effekt des LPS-Moleküls hervorgerufen wird. Untersuchungen von Cerami et al. in der Ratte zeigten jedoch, daß ein Sekretionsprodukt des Makrophagen, nämlich TNF- α , ein wichtiger Mediator des letalen Effektes von Endotoxin ist (Tracey, K.J. et al. Science (1986), 234: 470-474).

Beutler et al. konnte durch passive Immunisierung mit einem polyklonalen Antikörper gegen TNF- α zeigen, daß Mäuse resistent gegen den letalen Effekt von Endotoxin wurden (Science (1985) 229: 869-871). Diese Ergebnisse konnten mit monoklonalen Antikörpern in den Tiermodellen Maus und Pavian bestätigt werden (Shimamoto, Y. et al. Immun. Lett. (1988) 17: 311-318; Tracey, K.J. et al. Nature (1987), 330: 662-664).

Neben dieser zentralen Rolle beim septischen Schock zeigen neuere Untersuchungen das Vorhandensein von TNF- α bei Nierenabstoßungen, Transplantationen und Schocklunge (acute respiratory distress syndrom, ARDS) (Maury, C.P.J. and Teppo, A.-M., J. Exp. Med (1987) 166: 1132-1137). Piguet et al. zeigten, daß mit einem TNF- α -spezifischen polyklonalen Antikörper die Mortalität der Mäuse bei der GVHD (graft versus host disease, Transplantat-Wirt-Reaktion) stark reduziert werden konnte (J. Exp. Med. (1987) 166: 1280-1289).

Eine weitere Anwendung finden Antikörper bei der cerebralen Malaria (Grau, G.E., et al. Science

(1987) 237: 1210-1212).

In der EP-OS 260 610 ist die Verwendung von monoklonalen Antikörpern zum Nachweis und zur Bestimmung von TNF- α , zur Bekämpfung von Krankheiten und zur Isolierung von TNF- α mittels Immunadsorptionschromatographie beschrieben.

Es wurde nun gefunden, daß auch die durch Spaltung der monoklonalen TNF- α -Antikörper mit Pepsin bzw. Papain erhaltenen Fragmente sehr gute Eigenschaften besitzen.

Die Fragmente F(ab')₂ und F(ab) wurden nach dem Fachman bekannten Methoden hergestellt und ihre Eigenschaften unter in vitro- und in vivo-Bedingungen getestet.

Die Neutralisation der zytotoxischen Wirkung von TNF- α auf L929-Zellen konnte durch die Fragmente erreicht werden. Unter in vivo-Bedingungen in der Maus wird eine letale Dosis von TNF- α durch die Pepsin- und Papain-Fragmente neutralisiert.

Die hohe Assoziationskonstante (größer 10⁹ l pro Mol) und Spezifität lassen diese Reagentien bei Krankheiten Verwendung finden, wo ein erhöhter TNF- α -Spiegel eine Rolle spielt. Dabei haben die Fragmente gegenüber den kompletten Antikörpern den Vorteil, daß sie leichter in das Gewebe eindringen und im Körper eine reduzierte Immunantwort in Bezug auf neue Antikörperbildung hervorruft.

Da die erfindungsgemäßen Fragmente TNF- α inaktivieren, können sie zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden, bei denen die Konzentration an TNF- α im Blut erhöht ist, wie z.B. bei septischem Schock. Weiter kann bei folgenden Erkrankungen eine Behandlung mit den Fragmenten angezeigt sein: Transplantationen, GVHD, Allergien, Autoimmunkrankheiten, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Schocklungen, entzündliche Knochenkrankungen, Blutgerinnungsstörungen und Verbrennungen.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern.

Beispiel 1

In vitro-Neutralisation der zytotoxischen Aktivität von humanem TNF- α

Die zytotoxische Aktivität von TNF- α wurde, wie bei Aggarwal et al. (J. Biol. Chem. 1985, 260: 2345-2354) beschrieben, durch Lyse der Mauszell-Linie L929 (ATCC-Nr. CCL1) bestimmt. Bei Versu-



chen zur Neutralisation der zytotoxischen Aktivität von TNF- α durch das F(ab')₂- bzw. F(ab)-Fragment des monoklonalen Antikörpers mAK 195 wurde eine Konzentration an TNF gewählt, bei der mindestens 90 % der Zellen lysierten. Die Antikörper-Fragmente wurden in Medium auf eine Konzentration von 2 μ g/ml eingestellt und in eins zu zwei Schritten in Mikrotiterplatten verdünnt. Zu jeder Antikörperfragmentlösung (0,1 ml) wurden 0,05 ml rekombinanter TNF (2 ng/ml) gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte Zugabe von 50 000 L929-Zellen in 0,05 ml Medium und nach einer Inkubation von 20-24 h im Brutschrank bei 37 °C wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.

Der schützende Effekt der Antikörperfragmente zeigte sich durch die Färbbarkeit von intakten Zellen. Die Fragmente hemmen die zytotoxische Aktivität von TNF.

Beispiel 2

In vivo Neutralisation von human TNF- α

Der schützende Effekt der F(ab')₂- und F(ab)-Fragmente gegen human TNF wurde unter in-vivo-Bedingungen in männlichen Balb/c-Mäusen untersucht. 4-6 Wochen alte Mäuse wurden randomisiert und in Gruppen von 5 bzw. 10 Tieren aufgeteilt. Die Substanzen wurden intravenös in die laterale Schwanzvene gegeben (Applikationsvolumen 10 ml/kg). 24 h vor der rhu TNF- α -Applikation wurden die Tiere mit LPS 0,5 mg/kg i.v. "geprimed". TNF- α und LPS wurden vor der Injektion in Puffer A (150 mM NaCl und 0,18 % Rinderserumalbumin (Sigma, RIA-grade)), gelöst. Zur Messung der Neutralisierung wurde zuerst TNF gegeben, die mAK-Fragmente 15-30 min danach. Die Tötungsraten wurden nach 24 h bestimmt. In diesem Versuch zeigen die Fragmente eine starke Neutralisation von humanem TNF- α .

Beispiel 3

a) Herstellung von F(ab')₂-Fragmenten

Der monoklonale Antikörper mAK 195 wurde bei pH 4,5 in Gegenwart von 0,5M NaCl mit Pepsin gespalten (30 μ g Pepsin/mg mAb; 90 min; 37 °C). Ausfallende Fc-Fragmente wurden abzentrifugiert und der Überstand über eine Sephacryl® S-200 Gelfiltrationssäule (1,5 cm x 75 cm) chromatografiert. Die F(ab')₂-Fragmente enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Entfernung von

Antikörperresten über Protein-A Sepharose® filtriert.

b) Herstellung von Fab-Fragmenten

Der monoklonale Antikörper mAK 195 wurde bei pH 8,0 in Gegenwart von 0,5M NaCl mit Cystin-aktiviertem Papain (10 μ g/mg mAb; 4 h; 37 °C) gespalten. Anschließend wurde das Papain durch Zugabe von 20 mM Jodacetamid inaktiviert und das Gemisch über eine Sephacryl® S-200 Gelfiltrationssäule (1,5 cm x 75 cm) getrennt. Die Fab-Fragmente enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Entfernung der Fc-Fragmente über Protein A Sepharose® filtriert.

Die Bezeichnungen "Sephacryl" und "Sepharose" sind Warenzeichen der Firma Pharmacia.

Ansprüche

1. F(ab')₂- und/oder F(ab')-Fragmente des monoklonalen Antikörpers mAK 195.
2. F(ab')₂- und/oder F(ab')-Fragmente des monoklonalen Antikörpers mAK 195 zur Verwendung bei der Bekämpfung von Krankheiten.



(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

**0 350 690
A3**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 89111538.8

(51) Int. Cl.⁵: C07K 15/06, A61K 39/395

(22) Anmeldetag: 24.06.89

(30) Priorität: 14.07.88 DE 3823804

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
17.01.90 Patentblatt 90/03

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL SE

(88) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 04.07.90 Patentblatt 90/27

(71) Anmelder: BASF Aktiengesellschaft
Carl-Bosch-Strasse 38
D-6700 Ludwigshafen(DE)

(72) Erfinder: Moeller, Achim, Dr.
Wilhelm-Busch-Strasse 51
D-6703 Limburgerhof(DE)
Erfinder: Emling, Franz, Dr.
Valentin-Bauer-Strasse 22
D-6700 Ludwigshafen(DE)
Erfinder: Kurfuerst, Manfred, Dr.
Anilinstrasse 71
D-6733 Hassoeh(DE)
Erfinder: Meyer, Thomas, Dr.
Gruenerstrasse 14 a
D-6700 Ludwigshafen(DE)

(54) Neutralisation der in vitro- und in vivo-toxischen Eigenschaften von TNF- α durch monoklonale Antikörper und die davon abgeleiteten Fragmente.

(57) Es werden Fragmente des monoklonalen Antikörpers MAK 195 beschrieben, die sich zur Bekämpfung von Krankheiten eignen.

EP 0 350 690 A3





EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. CL.5)
D,Y	EP-A-0 260 610 (BASF A.G.) * Ansprüche 4,7,12; Seite 3, Zeilen 6-7,37-43; Beispiel 3 * ---	1,2	C 07 K 15/06 A 61 K 39/395
D,Y	NATURE, Band 330, 17. Dezember 1987, Seiten 662-664, London, GB; K.J. TRACEY et al.: "Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia" * Seite 662, rechte Spalte, Zeilen 4-13 * ---	1,2	
E	EP-A-0 355 067 (CELLTECH LTD) * Ansprüche 1-3; Spalte 2, Zeilen 22-46 * -----	1,2	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. CL.5)
			A 61 K C 12 P
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 10-04-1990	Prüfer RYCKEBOSCH A.O.A.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

